

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C07K 3/08, C12N 15/26 C12P 21/02	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/09623 (43) Date de publication internationale: 11 juin 1992 (11.06.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR90/00843 (22) Date de dépôt international: 23 novembre 1990 (23.11.90) (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): ROUSSEL- UCLAF [FR/FR]; 35, boulevard des Invalides, F-75007 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ABECASSIS, Pierre- Yves [FR/FR]; 11, square Vitruve, F-75020 Paris (FR). LECLAIRE, Jacques [FR/FR]; 1, rue de l'Epine Mon- tain, F-91300 Massy (FR). RIBERON, Philippe [FR/ FR]; 7, rue Plisson, F-94130 Nogent-sur-Marne (FR). (74) Mandataire: BOURGOUIN, André; Roussel-Uclaf, 111, route de Noisy, B.P. 9, F-93230 Romainville (FR).		(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet euro- péen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (bre- vet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: METHOD FOR PREPARING A PROTEIN COMPRISING AT LEAST ONE INTRAMOLECULAR DISUL- PHIDE BOND BY OXIDATION, AT A pH OF LESS THAN 5.0, OF THE REDUCED RECOMBINANT PRO- TEIN (54) Titre: PROCEDE DE PREPARATION D'UNE PROTEINE COMPORTANT AU MOINS UN PONT DISULFURE INTRAMOLECULAIRE PAR OXYDATION, A UN pH INFÉRIEUR A 5,0, DE LA PROTEINE RECOMBI- NANTE RÉDUITE CORRESPONDANTE (57) Abstract Method for preparing a protein comprising at least one intramolecular disulphide bond, and possibly one or more addi- tional cysteines, involving oxidation of the associated reduced recombinant protein by means of an oxidizing agent, and charac- terized in that an aqueous solution of the reduced protein is reacted at a pH of less than 5.0. (57) Abrégé Procédé de préparation d'une protéine comportant au moins un pont disulfure intramoléculaire, et éventuellement une ou plusieurs cystéines supplémentaires, comprenant l'oxydation de la protéine recombinante réduite correspondante à l'aide d'un agent d'oxydation et caractérisé en ce que l'on fait réagir une solution aqueuse de la protéine réduite à un pH inférieur à 5,0.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU ⁺	Union soviétique
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

+ Toute désignation de "SU" produit ses effets dans la Fédération de Russie. On ignore encore si une telle désignation produit ses effets dans les autres Etats de l'ancienne Union soviétique.

Procédé de préparation d'une protéine comportant
au moins un pont disulfure intramoléculaire par
oxydation, à un pH inférieur à 5,0, de la protéine
recombinante réduite correspondante.

5

La présente invention concerne un procédé de préparation d'une protéine comportant au moins un pont disulfure intramoléculaire par oxydation, à un pH inférieur à 5,0, de la protéine recombinante réduite correspondante.

10 De nombreuses protéines recombinantes à usage thérapeutique sont exprimées dans des systèmes hôtes variés parmi lesquels E. Coli, la levure et les cellules CHO représentent ceux les plus fréquemment utilisés.

Parmi ces protéines, les protéines hétérologues exprimées
15 mais non sécrétées par exemple dans la levure ou dans E. Coli sont en général accumulées sous forme d'aggrégats dénaturés à l'état de granules insolubles. Les procédés d'extraction nécessitent une mise en solution en milieu dénaturant à l'aide d'agents tels que l'urée ou la guanidine. Le repliement cor-
20 rect de la molécule, qui peut être ensuite réalisé par des méthodes variées connues et qui est nécessaire pour que la protéine manifeste son activité biologique, n'est pas toujours obtenu de façon sélective et conduit à des rendements variables, souvent faibles, selon la protéine recombinante
25 concernée en raison de la formation associée de conformères non actifs qu'il faut séparer par des techniques de purification connues, par exemple par chromatographie.

En particulier lorsque la protéine renferme au moins un pont disulfure intramoléculaire, et éventuellement une ou
30 plusieurs cystéines supplémentaires, la protéine recombinante non sécrétée est généralement produite à l'état réduit dans les granules. Ainsi lorsque le rétablissement d'un ou plusieurs ponts disulfure spécifiques, soit nécessaire à l'activité biologique de la protéine, soit qui contribue à une
35 augmentation de cette activité est désiré, le procédé d'oxydation doit assurer le repliement correct de la protéine sans formation des éventuels isomères indésirables correspondants à la formation au hasard de ponts intramoléculaires ou inter-

FEUILLE DE REMPLACEMENT

moléculaires.

Une mise au point concernant les réactions régiosélectives permettant la formation de ponts disulfure à partir de cystéines dans des chaînes peptidiques, obtenues par synthèse chimique, décrit une multiplicité de méthodes qui met en



FEUILLE DE REMPLACEMENT

évidence la difficulté à optimiser les rendements d'une façon générale et l'absence de résultats quantitatifs (F, Cavelier et al. Bull. Soc. Chim. Franc. 1989 n°6 788-798).

Des procédés d'oxydation contrôlée pour les protéines
5 produites par la technique du génie génétique ont été décrits, notamment dans le domaine des cytokines recombinantes renfermant au moins 2 cystéines et produites dans E. Coli, par exemple pour l'interféron β et l'interleukine 2 (IL2) dont les protéines naturelles correspondantes renferment 3 cystéines et
10 un pont disulfure ayant une position spécifique :

. le brevet US 4,530,787 décrit un procédé d'oxydation de protéines recombinantes complètement réduites illustré par l'application à une mutéine réduite de l'interféron β qui renferme 2 cystéines (exemple 1), à la desAla-IL2 réduite qui
15 renferme 3 cystéines (exemple 3) ou à une mutéine réduite de la desAla-IL2 qui renferme 2 cystéines (exemple 4), à l'aide d'iodosobenzoate à un pH compris entre 5,5 et 9,0, avec lequel on observe selon les conditions opératoires jusqu'à 10 à 15 % d'oligomères oxydés non désirés formés.

20 . le brevet US 4,572,798 décrit une oxydation contrôlée à l'aide de chlorure de cuivre à pH 8,0 en présence d'air à 25°C (exemple 2) ou à 37°C (exemple 3) de la mutéine de la desAla-IL2 ci-dessus dont l'application à la desAla-IL2 réduite ci-dessus conduit à la formation d'environ 15 % de produits
25 oxydés inactifs ayant des ponts disulfure isomères non désirés.

. M, P, Weir et al. (Biochem. J 1987 245 85-91) décrit un procédé d'oxydation de l'IL2 recombinante exprimée dans E. Coli en solution aqueuse à la concentration de 1 à 2 $\mu\text{g/ml}$, en
30 présence de guanidine, par action de sulfate cuivrique à pH égal à 8,5 qui nécessite ensuite une purification par chromatographie en phase inversée pour obtenir l'IL2 purifiée. De plus les auteurs indiquent que l'oxydation devient "extrêmement lente" lorsque le pH est inférieur à 6.

35 Ainsi en l'absence de méthode d'oxydation sélective quantitative des protéines recombinantes réduites comprenant au moins 2 cystéines, il est nécessaire après oxydation à un pH supérieur à 5,0 de faire une purification, en général par

chromatographie, qui élimine les produits d'oxydation correspondants à la formation incorrecte de ponts intramoléculaires isomères ainsi que de ponts intermoléculaires.

L'obtention d'une protéine recombinante oxydée homogène
5 pose donc des problèmes techniques de purification qui conduit à un abaissement du rendement en produit recherché.

Or il vient d'être découvert que, de façon surprenante, le procédé de préparation d'une protéine recombinante, comprenant au moins un pont disulfure, ne nécessite pas de stade de
10 purification ultérieur pour obtenir la protéine oxydée désirée homogène et permet donc d'obtenir la protéine avec un rendement amélioré si l'oxydation est conduite à pH acide, inférieur à 5,0.

L'objet de la présente invention concerne donc un procédé
15 de préparation d'une protéine comportant au moins un pont disulfure intramoléculaire, et éventuellement une ou plusieurs cystéines supplémentaires, comprenant l'oxydation de la protéine recombinante réduite correspondante à l'aide d'un agent d'oxydation et caractérisé en ce que l'on fait réagir une
20 solution aqueuse de la protéine réduite à un pH inférieur à 5,0.

La protéine concernée par l'invention est une protéine choisie parmi les polypeptides ayant une séquence en acides aminés naturelle ou synthétique, renfermant au moins un pont
25 disulfure intramoléculaire qui contribue à l'activité biologique de la protéine et éventuellement une ou plusieurs cystéines libres supplémentaires non engagées dans des ponts disulfure, par exemple la calcitonine, l'insuline, des cytokines, des récepteurs de cytokines ou le t-PA que l'on produit
30 par la technologie de l'ADN recombinant et isole à l'état réduit, selon les méthodes générales connues, avant le stade d'oxydation à pH acide qui fait l'objet de l'invention.

Par protéine naturelle on entend une protéine qui peut être isolée à partir de sources naturelles. Il est évident, en
35 effet, que le procédé est d'application tout à fait générale et peut être mis en oeuvre pour la préparation de toute protéine répondant aux critères ci-dessus.

Par état réduit on entend que les cystéines que contient

la protéine r nferment un groupement sulfhydryle libre dont la détermination peut être faite par exemple par spectrophotométrie avec la dithiodipyridine comme réactif des thiols.

L'agent d'oxydation utilisé pour la mise en oeuvre de
5 l'invention est choisi parmi les agents d'oxydation connus qui génèrent un atome d'oxygène activé, soit directement tel qu'un dérivé d'iodosylaryle, par exemple un acide iodosobenzoïque, soit indirectement tel que l'iode en présence d'eau ou tel
10 qu'un complexe cuivrique, par exemple le complexe cuivrique formé avec l'o-phénanthroline, ou un sel cuivrique, par exemple le sulfate cuivrique, en présence d'air, et à l'action duquel on soumet, éventuellement en présence d'air, la protéine recombinante réduite. On utilise de préfé-
15 rence comme agent d'oxydation l'acide o.iodosobenzoïque sous une atmosphère d'argon ou le sulfate cuivrique en présence d'air.

La concentration de l'agent d'oxydation varie selon l'agent utilisé. Par exemple, lorsque l'agent est le donneur
20 direct d'oxygène tel que l'acide o.iodosobenzoïque, la concentration est dans un rapport au moins stoechiométrique avec la concentration en pont disulfure à former et lorsque l'agent active directement l'oxygène, par exemple l'oxygène de l'air, tel que le sulfate cuivrique, la concentration est inférieure
25 ou égale à la concentration équivalente en protéine à oxyder.

La température du mélange réactionnel peut être choisie par exemple entre 15°C et 40°C, de préférence à environ 37°C.

La durée de la réaction d'oxydation dépend des conditions opératoires ci-dessus. D'une façon générale la réaction est
30 terminée en moins de 3 heures, de préférence environ 1 heure.

A la fin de la réaction, la protéine oxydée désirée homogène obtenue peut être directement récupérée selon des méthodes connues, par exemple par lyophilisation.

Le procédé de l'invention concerne particulièrement un
35 procédé caractérisé en ce que la protéine réduite a la séquence en acides aminés d'une protéine naturelle, d'allèles ou de dérivés de celle-ci.

Par allèles ou dérivés, on inclut les séquences modifiées

par substitution ou d'létion de un ou plusieurs acides aminés autres que les cystéines qui forment le ou les ponts disulfure que comporte naturellement la protéine désirée aussi bien que l'addition de un ou plusieurs acides aminés, y compris de
5 cystéines qui peuvent éventuellement contribuer à la formation de ponts disulfure qui n'existent pas dans la protéine naturelle pour autant que ces produits conservent l'activité biologique de la protéine naturelle. L'obtention de telles modifications est bien connue dans la méthode de l'ADN recom-
10 binant, par exemple par les techniques de la mutagenèse dirigée.

Le procédé de l'invention concerne plus particulièrement un procédé caractérisé en ce que la protéine est choisie parmi les cytokines, de préférence l'IL2. Les cytokines de l'inven-
15 tion peuvent être soit des cytokines dont la protéine naturelle comporte un seul pont disulfure, par exemple le TNF alpha ou l'interleukine 3, ou plusieurs ponts disulfure, par exemple l'interféron alpha, l'interleukine 6 ou le GM-CSF, et éventuellement comporte une
20 ou plusieurs cystéines supplémentaires, par exemple l'interféron B, le G-CSF, l'interleukine 4 ou l'IL2, soit des allèles ou dérivés de celles-ci, par exemple des mutéines de l'IL2 telles que décrites dans le brevet EP 0109748 B ou des dérivés de l'IL2 ayant par exemple une
25 délétion d'un ou plusieurs acides aminés à l'extrémité N-terminale tels que décrits dans la demande de brevet EP 0219839.

Les protéines et notamment les cytokines réduites nécessaires à la mise en oeuvre de l'invention sont des protéines,
30 soit directement produites et isolées à l'état réduit à partir de la souche hôte et stabilisée en milieu acide par exemple selon le procédé décrit dans la demande de brevet EP 0353150, soit que l'on prépare par réduction totale de la protéine oxydée ou d'un mélange de la protéine oxydée et de la protéine
35 réduite, renfermant éventuellement des ponts isomères indésirés que l'on peut effectuer selon des méthodes connues à l'aide d'un agent réducteur tel que le dithiothreitol ou le mercaptoéthanol.

Le procédé de l'invention est spécialement caractérisé en ce que le pH est compris entre 0,5 et 5,0, de préférence environ 3,0. Le pH désiré de la solution réactionnelle peut être obtenu à l'aide soit d'un acide minéral par exemple l'acide chlorhydrique ou l'acide borique soit d'un acide organique choisi parmi les acides monocarboxyliques ou polycarboxyliques tel que l'acide formique, acétique, propionique, trifluoroacétique, oxalique ou citrique, de préférence l'acide acétique.

Le procédé est également caractérisé en ce que la concentration de la protéine est comprise entre 0,05 mg/ml et 50 mg/ml, de préférence entre 0,1 et 10 mg/ml.

Le procédé de l'invention concerne plus spécialement un procédé caractérisé en ce que la protéine est une IL2 humaine recombinante réduite non glycosylée ayant au moins 2 cystéines en position 58 et 105.

L'IL2 ci-dessus ayant au moins 2 cystéines en position 58 et 105 peut être éventuellement une mutéine recombinante de l'IL2 naturelle dans laquelle la cystéine en position 125 a été substituée par un autre acide aminé, par exemple la sérine telle que l'IL2-Ser125 qui a été décrite (G. Ju et al, J. Biol. Chem. 262 n°12 avril 25 5723-5731) et dont la préparation sous forme réduite peut être obtenue par exemple selon le procédé décrit dans la demande de brevet EP 0353150.

Le procédé de l'invention concerne tout spécialement un procédé caractérisé en ce que la protéine est une IL2 humaine recombinante réduite non glycosylée ayant 3 cystéines en position 58, 105 et 125 et qui manifeste une activité biologique comparable à celle de l'IL2 oxydée correspondante ayant un pont disulfure en position 58-105. Une telle IL2 et un exemple de préparation de celle-ci sont décrits dans la demande de brevet EP 0353150.

Les conditions préférées du procédé de l'invention sont caractérisées en ce que l'on fait réagir l'IL2 réduite ci-dessus en solution à environ 1 mg/ml, à un pH environ égal à 3,0, à une température environ égale à 37°C, en présence d'air avec du sulfate cuivrique à une concentration à environ 66 µM. A la fin de la réaction qui peut être suivie par une méthode analytique telle que la mesure de la consommation en oxygène à

l'aide d'une électrode de Clark ou une chromatographie liquide haute performance en phase inversée (RP-HPLC) qui sépare la forme oxydée de la forme réduite de départ, la solution obtenue de l'IL2 attendue peut être ensuite conservée par exemple à 4°C ou lyophilisée directement et éventuellement faire l'objet d'une formulation pharmaceutique selon des méthodes connues.

Toutes les publications qui sont citées sont incorporées, par référence, dans le texte de la présente demande.

10 Les figures ci-annexées illustrent le procédé décrit plus loin :

La figure 1a est la courbe de la concentration en μ Moles d'oxygène dissous de la solution réactionnelle de l'exemple 1 en fonction du temps et la figure 1b est la courbe de pourcentage d'IL2 oxydée en fonction du temps, calculée d'après la concentration en oxygène dissous.

Les figures 2a à 2d représentent 4 chromatogrammes de RP-HPLC analytique de la solution réactionnelle de l'exemple 1 en fonction du temps : la figure 2a représente la solution à t = 0 mn, la figure 2b représente la solution à t = 15 mn, la figure 2c représente la solution à t = 30 mn, la figure 2d représente la solution à t = 60 mn.

L'exemple suivant illustre l'invention sans la limiter :

EXEMPLE 1 : Oxydation d'IL2 humaine recombinante non glycosylée (r-hIL2) réduite.

1) Partie expérimentale :

La r-hIL2 réduite de départ est une fraction "59" préparée selon le procédé décrit à l'exemple 1 ou 2 de la demande de brevet EP 0353150 dans lequel on remplace l'acide citrique du gradient linéaire d'isopropanol (20 à 70 % sur 40 mn) par de l'acide trifluoracétique (TFA) à la concentration de 0,1 % et que l'on a immédiatement lyophilisée à raison d'1 mg d'IL2 réduite par flacon-dose.

L'oxydation de 1 mg de l'IL2 réduite ci-dessus est réalisée à 37°C et à pH # 3 par mise en solution dans 1 ml d'une solution aqueuse d'acide acétique à la concentration de 0,1 % dans laquelle on ajoute 100 μ l d'une solution 0,67 mM de sulfate cuivrique. La cinétique de l'oxydation est suivie d'une

part par mesure en continu de la consommation en oxygène à l'aide d'une électrode de Clark (figure 1a), d'autre part par RP-HPLC analytique sur une colonne C4 VYDAC (0,46 x 15 cm) 300 Å, 5 microns, au débit de 2 ml/mn, avec un gradient
5 linéaire d'acétonitrile (30 à 70 % sur 10 mn) contenant 0,1 % de TFA et une détection spectrophotométrique à 280 nm dont on évalue la surface des pics respectifs de l'IL2 réduite de départ élue à environ 60 % d'acétonitrile (figure 2a) et de l'IL2 oxydée élue à environ 57 % d'acétonitrile formée au
10 cours de la réaction (figures 2b à 2d).

Les figures ci-dessus montrent que l'IL2 est oxydée à environ 40 % à $t = 15$ mn (figure 2b), à environ 60 % à $t = 30$ mn (figure 2c) et à environ 100 % à $t = 60$ mn (figure 2d).

15 La solution réactionnelle après oxydation à $t = 60$ mn est ensuite soumise directement aux différentes analyses.

2) Résultat des analyses :

- la teneur en groupement sulfhydryle déterminée par
20 spectrophotométrie à 343 nm avec la dithiodipyridine comme réactif des thiols est de 0,85 SH/mole d'IL2 oxydée obtenue, comparée à une teneur de 2,87 SH/mole d'IL2 réduite de départ.

- la localisation de pont disulfure déterminée selon la méthode décrite par Yamada et al. (Arch. Biochem. Biophys.
25 1987, 257, 194-199) conclue à la présence d'un pont disulfure en position 58-105 et d'un thiol libre en position 125.

- l'activité biologique déterminée par mesure de la prolifération de lignées cellulaires leucémiques de souris dépendantes de l'IL2 CTLL-2, avec un test colorimétrique au
30 sel de tétrazolium (Mossmann, T J. Immunol. Meth. 1983 65 55-63), est de $2,0 \times 10^7$ U BRMP/mg, comparée à une activité de $1,5 \times 10^7$ U BRMP/mg pour l'IL2 réduite de départ.

REVENDICATIONS

- 1) Procédé de préparation d'une protéine comportant au moins un pont disulfure intramoléculaire, et éventuellement une ou plusieurs cystéines supplémentaires, comprenant l'oxydation de la protéine recombinante réduite correspondante à l'aide d'un agent d'oxydation et caractérisé en ce que l'on fait réagir une solution aqueuse de la protéine réduite à un pH inférieur à 5,0.
- 2) Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la protéine réduite a la séquence en acides aminés d'une protéine naturelle, d'allèles ou de dérivés de celle-ci.
- 3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la protéine est choisie parmi les cytokines, de préférence l'IL2.
- 4) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le pH est compris entre 0,5 et 5,0, de préférence environ 3,0.
- 5) Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la concentration de la protéine est comprise entre 0,05 mg/ml et 50 mg/ml, de préférence entre 0,1 et 10 mg/ml.
- 6) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la protéine est une IL2 humaine recombinante réduite non glycosylée ayant au moins 2 cystéines en position 58 et 105.
- 7) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que la protéine est une IL2 humaine recombinante réduite non glycosylée ayant 3 cystéines en position 58, 105 et 125 et qui manifeste une activité biologique comparable à celle de l'IL2 oxydée correspondante ayant un pont disulfure en position 58-105.
- 8) Procédé selon la revendication 7 caractérisé en ce que l'on fait réagir l'IL2 réduite en solution à environ 1 mg/ml, à un pH environ égal à 3,0, à une température environ égale à 37°C, en présence d'air avec du sulfate cuivrique à une concentration à environ 66 μ M.

1/3

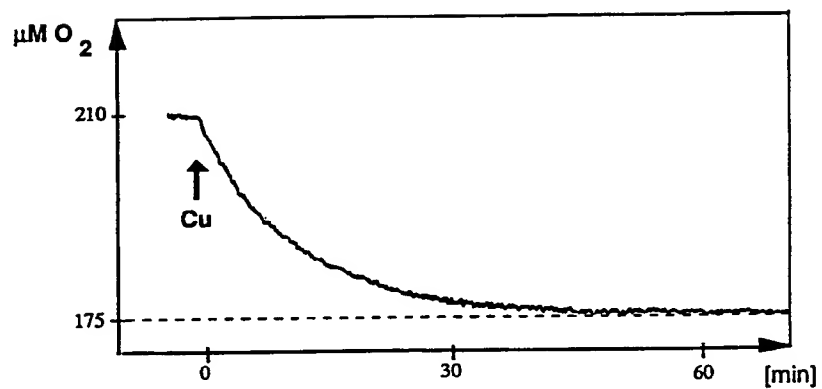


Figure 1a

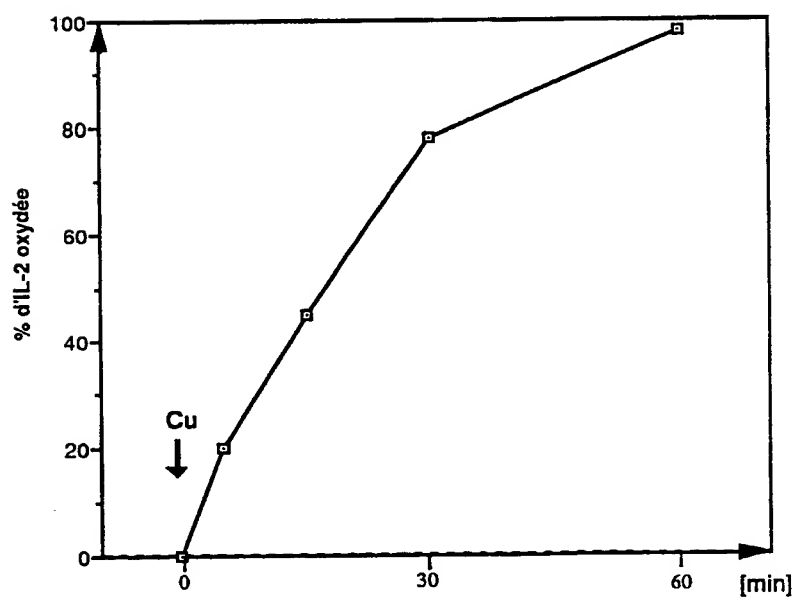


Figure 1b

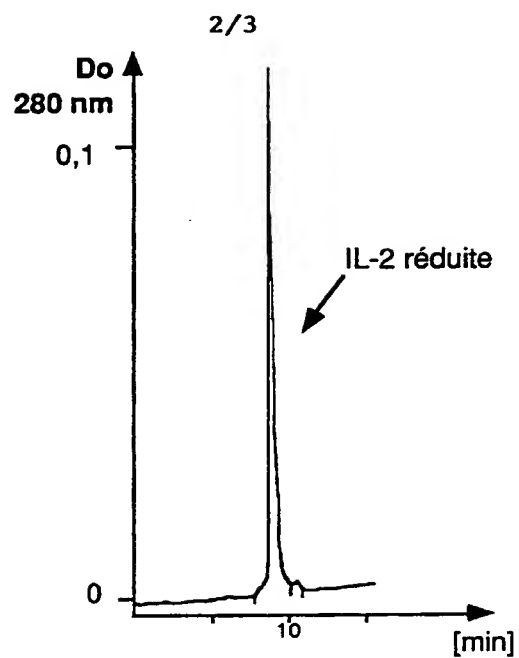


Figure 2a

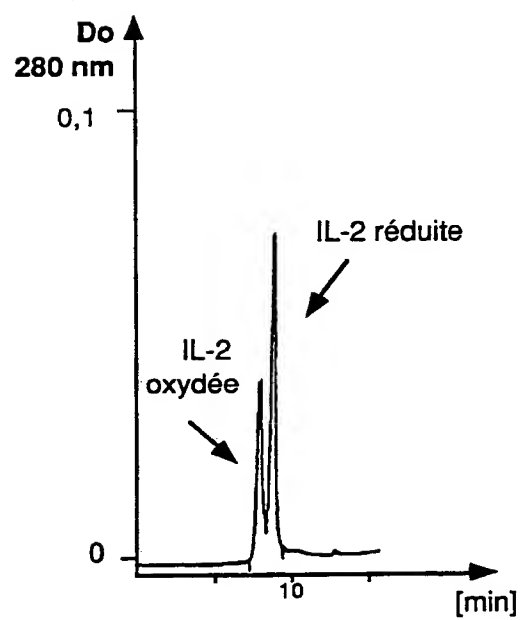


Figure 2b

3/3

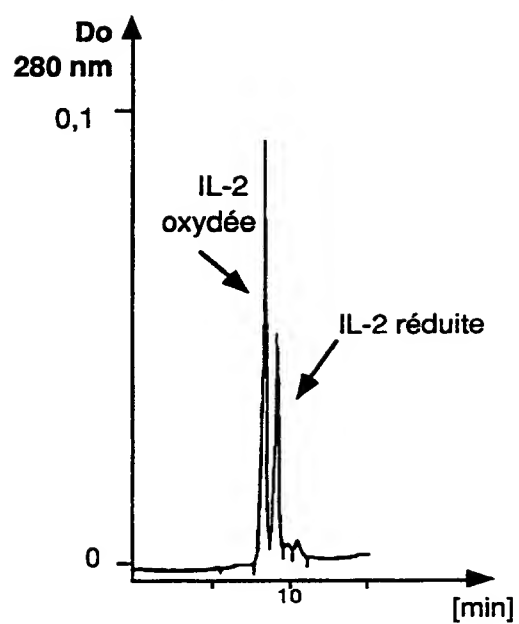


Figure 2c

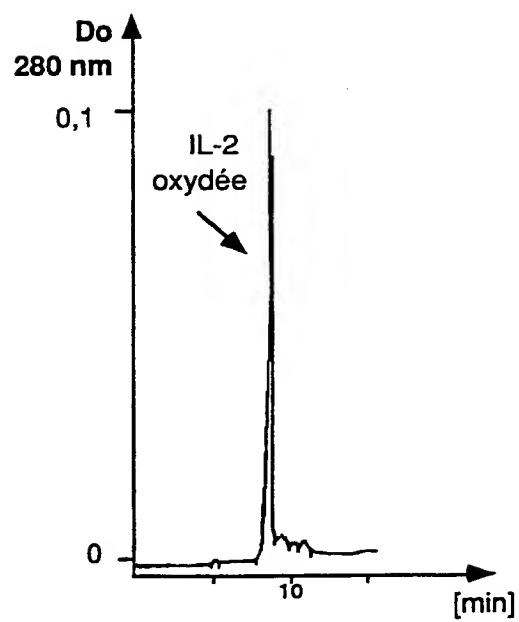


Figure 2d

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR90/00843

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl.5 C07K 3/08, C12N 15/26, C12P 21/02		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ?		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl.5	C07K, C12N, C12P	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such documents are included in the fields searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	EP, A, 0185459 (CETUS CORP.) 25 June 1986 see page 3, lines 8-31; page 5, line 21- page 6, line 9; page 7, line 1- page 9, line 32; figure 6; cited in the application	1-8
A	EP, A, 0360937 (CETUS CORP.) 4 April 1990 see page 6, line 42- page 7, line 10	1-8
A	Methods in Enzymology, Vol. 107, 1984, Academic Press, Inc., (New York, US) T.E. Creighton: "Disulfide bond formation in proteins", pages 305-329 see page 314 (choosing the conditions)	1-8

<p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
24 July 1991 (24.07.91)	27 August 1991 (27.08.91)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9000843
SA 42611

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 21/08/91
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0185459	25-06-86	US-A- 4572798	25-02-86
		AU-B- 594930	22-03-90
		AU-A- 5005285	12-06-86
		CA-A- 1248300	03-01-89
		GB-A, B 2168055	11-06-86
		JP-A- 61140600	27-06-86

EP-A- 0360937	04-04-90	None	

EPO FORM P479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 90/00843

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB⁵: C 07 K 3/08, C 12 N 15/26, C 12 P 21/02		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁵	C 07 K, C 12 N, C 12 P	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie [*]	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
A	EP, A, 0185459 (CETUS CORP.) 25 juin 1986 voir page 3, lignes 8-31; page 5, ligne 21 - page 6, ligne 9; page 7, ligne 1 - page 9, ligne 32; figure 6 cité dans la demande --	1-8
A	EP, A, 0360937 (CETUS CORP.) 4 avril 1990 voir page 6, ligne 42 - page 7, ligne 10 --	1-8
A	Methods in Enzymology, volume 107, 1984, Academic Press, Inc., (New York, US), T.E. Creighton: "Disulfide bond formation in proteins", pages 305-329 voir page 314 (choosing the conditions) -----	1-8
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« Δ » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">24 juillet 1991</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">27 AUG 1991</div>
Administration chargée de la recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">OFFICE EUROPEEN DES BREVETS</div>		Signature du fonctionnaire autorisé

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9000843

SA 42611

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 21/08/91
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0185459	25-06-86	US-A- 4572798	25-02-86
		AU-B- 594930	22-03-90
		AU-A- 5005285	12-06-86
		CA-A- 1248300	03-01-89
		GB-A, B 2168055	11-06-86
		JP-A- 61140600	27-06-86
EP-A- 0360937	04-04-90	Aucun	

EPO FORM P0072

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82